使用指导

IMMUNOSCAN RA

EURO-DIAGNOSTICA

IMMUNOSCAN RA
(Mark 2)

抗环状瓜氨酸肽抗体诊断试剂盒
(第二代)

用于检测类风湿关节炎特异性自身免疫
抗体（抗 CCP 的 ELISA 检测）

仅供专业人士使用

7 月，2004

抗 CCP 抗体试剂盒使用说明书

简介

欧洲诊断试剂公司的抗环状瓜氨酸诊断试剂盒（抗 CCP）第 2 代，是一种 ELISA 体外诊断试剂盒，通过人工合成的瓜氨酸多肽抗原与血清或血浆中的抗环状瓜氨酸肽抗体的反应，可以检测出血清或血浆中所含有的特异性抗体。由于其高特异性，该检测可用于类风湿关节炎（Rheumatoid Arthritis，RA）的诊断。在该试剂盒中，可做 96 个检测。该试剂盒即可做定性检测，又可作定量检测（利用标准曲线）。参考标准和对照推荐做复孔检测，样品可以做单孔也可以做复孔。同时该试剂盒含有测试所需的所有试剂。
该试剂盒只被专业实验室的专业人员使用。

介绍

类风湿关节炎（Rheumatoid Arthritis，RA）是一种最常见的系统性自身免疫疾病。目前，该病影响到全世界 1-2%人的口，但是病因学尚不清楚。类风湿关节炎的诊断目前主要依赖于通过该病的临床症状来判断。仅有的血清学检测是判断血清中是否含有类风湿因子（Rheumatoid factor）的存在。类风湿因子直接作用于 IgG 亚类中免疫球蛋白恒定区的抗体。但是这些抗体在其他的自身免疫疾病病人、感染病人、甚至健康人血清中（最高可达 15%）也以很高的比例存在。

许多特异性更高的天然抗体在 RA 病人血清中被发现(1)。据报道，抗核周因子抗体（Anti-perinuclear factor，APF）存在于 50%的类风湿病人体内，约具有 70%的特异性（2）。最近该抗体的抗原决定簇被鉴定出来为微丝蛋白（Filaggrin）中的瓜氨酸残基（2），这个发现导致了许多特异识别 RA 病人血清中自身免疫抗体的多肽的发展，并且将其运用到 RA 特异性抗体的酶联免疫检测中（3）。临床评价研究显示这些检测在大量 RA 病人血清中为阳性,而且有很高的特异性(3-8)。其中**抗-CCP 抗体**被发现可用于类风湿关节炎的早期诊断，并对 RA 病人的关节侵害和放射学损伤具有一定的预测价值(7,9-14)。抗 CCP 抗体可以在 RA 病人出现明显的关节损伤之前（14）被检测出。一项前瞻性群组研究显示，在没有出现明显的 RA 临床症状的抗 CCP 阳性的病人中，约有 93%的病人会发展成 RA，表明该抗体有非常好的阳性预期值（14）。由欧洲诊断试剂公司研发的抗环状瓜氨酸肽抗体诊断试剂盒以高度纯化的含瓜氨酸残基的合成多肽为基础，是在类风湿关节炎诊断中的极具价值的辅助诊断方式。该试剂盒采用的环状瓜氨酸肽，是从与类风湿关节炎病人自身抗体反应最佳的抗原中筛选出的（8-14）。

RA 多肽免疫酶联反应的原理

抗环状瓜氨酸肽抗体诊断试剂盒是建立在酶联免疫反应的基础上。该测试使用了含瓜氨酸肽（抗原）包被的微孔板。将稀释后的病人血清或血浆被放入微孔中孵育。如果有特异抗体存在，它将会与微孔中的抗原结合。没有结合的其他成分在洗涤后会被洗掉，任何被束缚的抗体在加入辣根过氧化物酶标记的抗人的 IgG 后、经第 2 步洗涤、底物孵育之后就会被检测出来。

反应抗体的存在将会导致颜色的出现，颜色的深浅与所束缚的抗体的量成比例，并可通过分光光度计测出。

特异性与敏感性

抗环状瓜氨酸肽抗体所对应的抗原为人工合成的含有瓜氨酸多肽。该测试在相关的单元采用阳性病人的血清定标。标准曲线的范围从 25-1600 单位/毫升。由于没有抗 CCP 定量的国家标准，所以这些值由被欧洲诊断试剂公司选择的。其特异性和敏感性在临床研究机构中通过在 311 个类风湿关节炎病人、942 个非类风湿关节炎病人（包括其它自身免疫基病患者）和 330 个健康对照中的运用而得到评价。其敏感性达到了 70%，在非类风湿关节炎病人中的特异性为 97%，在健康个体中的特异性达到 99%。

抗 CCP 抗体试剂盒使用说明书

贮存和处理方式

- ＋2°C～＋8°C，避光保存。
- 不要使用过期的试剂。
- 建议打开包装之后立即使用。
- 任何使显色液直接见光的操作都应该避免。
- 如果下列现象发现，则表明溶液降解：
  在显色液被滴到微孔板之后即呈蓝色，
  第一标准物 A（1600 单位/毫升）， 在 E450nm<0.9 时仅有微弱反应或无颜色的变化。

试剂盒内容

试剂盒内容：
- 1 个（12×8）的多肽包被的微孔板，即用。
- 5 瓶 1.2ml 的标准品（阳性人血清），即用。
- 1 瓶 1.2ml 参考对照人血清，即用（蓝色）。
- 1 瓶 1.2ml 阳性对照人血清（标签上以 units/ml 为单位），即用（蓝色）。.
- 1 瓶 1.2ml 阴性对照人血清，即用（蓝色）。.
- 1 瓶 15ml 联接溶（过氧化物酶联接的抗人 IgG 抗体），即用(红色)。
- 1 瓶 15ml 底物反应液 TMB，即用。
- 2 瓶 35ml 的稀释液，即用（蓝色）。.
- 1 瓶 15ml 的终止液，即用。
- 2 瓶 35ml 的润洗液（20×浓度）

警示

1. 终止液含有 5%的硫酸，不要让该溶液接触皮肤。
2. 避免所有的生物物质接触皮肤和粘膜。
3. 不要使用口吸式吸管。
4. 人血清的对照和标准品，虽然经过检验证实对艾滋病抗体（HIV1＋2）、乙型肝炎表面抗原（HbsAg）、艾滋病抗原（HIV1）呈阴性反应，但仍然需要将其看作有潜在感染可能的对待。
5. TMB 对于呼吸道、皮肤接触、吞咽有毒性，处理时需非常小心。
6. 不要用过期的成分，也不要将不同批号的产品混用。
7. 微孔板上每个孔最后将被当作 1 个比色皿，用作测定光吸收值。因此，不要接触微孔板的底部并且防止破损和弄脏。
8. 严格的遵守操作手册，就会得到好的结果。仔细的吸取和洗涤，才可以得到精确的结果。
9. 对照物、标准物、和稀释液均含有 0.09% 的叠氮化钠。.

样品的准备

该测试被用于血清和枸橼酸钠的血浆样本。若用血清，则采用静脉血并使之凝结即可。贮存样品最长时间为 4-8°C，48 小时。若想延长储存期则可放置于－20°C冻存。按 1：50 稀释病人血清(吸取 10μl 血清在 490μl 的稀释缓冲液中。在实验中用 100μl。（参见检验程序，第 7 页）

试剂的准备和操作

在测试之间，应将 96 孔板和各试剂置于室温，在 96 孔板达到室温之后再开启包装。各种试剂应彻底混匀。
试剂盒所带试剂足够完成 96 个检测（包括标准和对照的分析）。
标准和对照使用复孔检测。

缓冲液和 TBM 可能含有盐的晶体，在 37°C即可溶解。
1． 使用完试剂之后应立刻将其置于黑暗、避光处 2-8°C储存。
2． 多肽包被 96 微孔板，即用。
96 孔板的剩余条带，可再密封后，贮存在 2-8° C。
3．润洗缓冲液（35㎖）:
润洗缓冲液使用前应被稀释 20 倍。
加 35 毫升润洗缓冲液到 665 毫升蒸馏水中，彻底混匀。
4． 底物反应液 TMB（15㎖）：
即用，避光保存，在 4°C时底物反应液可能会有沉淀。（参见上面）.
5． 稀释缓冲液（35㎖）：即用。
6．连接溶液（15㎖）：即用。
7． 终止液（15㎖）：即用。
8． 标准物 A-E（1.2㎖）。
5 个稀释过的阳性的人血清标准液，其值均用相应的单位表示。标准物 A 含有 1600 单位/毫升，B 含有 800 单位/毫升，C 含有 200 单位/毫升，D 含有 50 单位/毫升，E 含有 25 单位/毫升，即用。
9． 参考对照 (1.2 ㎖)．稀释过的人血清，即用。
10．阴性对照(1.2 ㎖)．稀释过的人血清，即用。
11．阳性对照(1.2 ㎖)．稀释过的人血清，即用。

检验程序

润洗原则

在两个免疫孵育过程之间，没有附着的酶联免疫反应的成分应该被彻底地清除。这个目的可以通过润洗来达到。所以在每一步的润洗过程中应该足够小心；以确保能够得到理想的结果。润洗过程可以手工洗涤也可以用自动平板洗涤装置：

手工洗涤：

1． 翻转微孔板，迅速垂直倒空微孔板。
2． 每孔加洗液 300μl。
3． 洗板 3 次。
4． 通过拍打，将倒置的微孔板中的残余液体到净。
5． 在洗水纸上拍打翻转的酶标板，去除残留液。
6． 立刻加下一步溶液。

用自动平板洗涤装置来洗涤

当用自动平板洗涤装置来洗涤时，检查在每一个清洗循环中是否所有的孔都被吸干净，并且润洗缓冲液是否都达到了每孔的边缘。同时必须严格按照清洗要求认真完成 3 个清洗循环，才能进行下一步地的操作。

检测原则

根据样品准备章节第 6 页的要求准备样品（例如：将稀释缓冲液 1：50 稀释），试剂依据试剂准备和操作章节备用。待用的微孔板不要清洗！检验病人的血清可单孔也可复孔。

定量检测

1． 吸取 100 µL l稀释液于两孔：（A_1，A_2: 空白).
2． 分别吸取 100µL 的A-E标准物于两孔(B_1，B_2 – F_1，F_2).
3． 吸取 100µL的阴性、阳性对照于两孔（G_1，G_2- H_1，H_2).

4. 吸取 100μL 的稀释后的病人血清将其加至到 96 孔板中的剩余孔中，1-4 步的加样时间应不超过 15 分钟。
5. 室温(18-25° C)，在湿润的孵育箱中孵育 60 分钟。
6. 弃去微孔板中的溶液，并按照润洗规则润洗。
7. 吸取 100μL 的联结液加入每孔。
8. 室温(18-25° C)，在湿润的孵育箱中孵育 30 分钟。
9. 弃去联结液，并按照润洗规则润洗。
10. 吸取 100μl 的底物反应液至每孔。
11. 室温(18-25° C)，在湿润的孵育箱中孵育 30 分钟。
12. 吸取 100μL 的终止液至每孔
13. 在 450nm 处读取各孔的光吸收值。

定性检测

用参考对照替代标准物，其他步骤与定量检测相同。

有效性

对与定量检测来说，标准物 A(1600 单位/毫升)的 OD 值应该≥0.9。计算各标准物和对照两孔的均值。对照的计算参见下面。

阳性对照的结果应该在以单位/毫升为单位的范围之内，而阴性对照应该<25 单位/毫升。如果未达到则表明该测试结果无效，应重试。

对与定性检测来说，阳性对照和参考对照的比值应在标签所示的范围之内，而阴性对照和参考对照的比值应<1.0。

结果

定量检测步骤

从标准物,对照和样品孔的吸光值中减去 A_1，A_2 空白孔吸光度的均值。以五个标准物吸光度值（复孔的均值）为 Y 轴，以各标准物浓度的对数值自然对数为 X 轴，做曲线。该曲线应该在 25-1600 单位/毫升范围之内呈线性。通过样品的光吸收值，即可在由标准物所确定的标准曲线上找到其所对应的浓度自然对数值。此外，相应的软件中的 4 参数的曲线也可以用来完成该计算。

5 个标准物（A-E）的浓度被设计为 1600 单位/毫升（A）,800 单位/毫升（B），200 单位/毫升(C)，50 单位/毫升(D)，25 单位/毫升(E)。由于没有公认的国际标准或国家标准，因此这些值是由欧洲诊断试剂公司自己设定的。如果样品的浓度比标准物 A（1600 单位/毫升）高，则可以将样品以更高的稀释比稀释后重新测定。目前尚未有任何证据证明所得到的单位可以用作测量这种疾病严重性。从不同病人血液中得到的抗体可能有不同的亲和性，这就表明该测试测量的是自身抗体的免疫反应性而不是抗体浓度。

标准曲线不能被用于光吸收值低于标准物 E（25 单位/毫升）的计算。所得的值应该写明<25 单位/毫升。

定性步骤

从对照和样品孔的吸光值中减去 A_1，A_2 空白孔吸光度的均值。

计算每个样品及对照的吸光度比值（光密度）。

$$\text{吸光度比值} = \frac{\text{对照 或者 样品 OD}}{\text{参考对照 OD}}$$

评价标准

定量步骤

其结果为< 25 单位/毫升的样品被认为是阴性。结果≥25 单位/毫升的样品被认为是阳性。当病人测试结果为≥25 单位/毫升，却 <50 单位/毫升时被认为是弱阳性，应该在稍后的时间里重新测试。

定性步骤

使用者应该计算出一个适合本地区人群的阴阳性界值。欧洲诊断通过临床实验结果推荐的参考值为：

吸光度值比	结果注释
< 0.95	阴性
≥ 0.95 to ≤ 1.0	临界值 - 建议重测
> 1.0	阳性

产品性能特点

试验结果的重复性

表 1.
3 个血清 8 次重复测试用于评价不同检测之间的可重复性。

	高		中		低	
	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD
平均值	1007.4	1.918	240.1	1.179	95.7	0.686
S.D.	128.5	0.05	15.5	0.04	6.7	0.03
%C.V.	12.8	2.8	6.5	3.3	7.0	4.9

表 2.
3 个不同批号的 3 种血清 8 次重复测试用于评价不同批号之间的可重复性。

	高		中		低	
	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD
平均值	1116.6	2.049	255.1	1.266	99.4	0.723
S.D.	136.6	0.10	22.8	0.08	8.7	0.05
%C.V.	12.2	5.1	8.9	6.0	8.7	6.4

表 3.

3 个血清在 3 种不同的测试场合 8 次重复测试用于评价不同检测之间的可重复性。

	高		中		低	
	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD	单位/毫升	OD
平均值	1105.9	1.955	257.4	1.205	93.1	0.673
S.D.	129.5	0.05	20.2	0.04	5.6	0.04
%C.V.	11.7	2.6	7.9	3.4	6.0	6.5

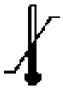
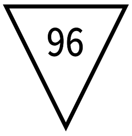
参考文献

1. Van Boekel, M., Vossenaar, E., Van den Hoogen, F., Van Venrooij, W., Autoantibody systems in Rheumatoid Arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. Arthritis Res. 4, 87-93 (2002).
2. Nienhuis, R. & Mandema, E., A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis.The anti perinuclear factor. Ann. Rheum. Dis. 23, 302-305 (1964).
3. Schellekens, G., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Van de Putte, L.,Van Venrooij, W., Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. J. Clin. Invest. 101, 273-281 (1998).
4. Van Jaarsveld, C., Ter Borg, E., Jacobs, J., Schellekens, G., Gmelig-Meyling, F.,Van Booma-Frankfort, C., De Jong, B., Van Venrooij, W.J., Bijlsma, J., The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early Rheumatoid Arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 17, 689-697 (1999).
5. Schellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van den Hoogen, F., Hazes, J., Breedveld, F.,Van Venrooij, W., The diagnostic properties of Rheumatoid Arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum. 43, 155-163 (2000).
6. Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D., Tozzoli, R., Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for Rheumatoid Arthritis.Clinical Chemistry. 47, 1089-1093 (2001).
7. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F., Hazes, J., How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent (erosive) arthritis.Arthritis Rheum. 46, 357-365 (2002).
8. Van Venrooij, W., Hazes, J., Visser, H., Anti-citrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early Rheumatoid Arthritis. Neth. J. Med. 60, 383-388 (2002).
9. Vossenaar, E., Van Venrooij, W., Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. Clin. Applied Imm. Rev. 4, 239-262 (2004).
10. Meyer, O., Labarre, C., Dougados, M., Goupille, Ph., Cantagrel, A., Dubois, A., Nicaise-Roland, P., Sibilia, J., Combe, B., Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early Rheumatoid Arthritis for

predicting five year radiographic damage. Ann. Rheum. Dis 62, 120-126 (2003).
11. Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Van Venrooij, W., Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of Rheumatoid Arthritis.Arthritis Rheum. 48, 2741-2749 (2003).
12. Forslind, K., Ahlmén, M., Eberhardt, K., Hafström, I., Svensson, B., Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). Ann. Rheum. Dis. (in press).
13. Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T., Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early Rheumatoid Arthritis (the TIRA project). Ann. Rheum. Dis. (in press).
14. van Gaalen, F., Linn-Rasker, S., Van Venrooij, W., de Jong, B., Breedveld, F., Verweij, C., Toes, R., Huizinga, T., Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. Arthritis Rheum. 50, 709-715 (2004).

附录

标签中使用的符号

LOT	批号
REF	目录号
	用于
	温度范围
	生物危险
	参照使用说明
IVD	体外诊断用
	生产商
	检验的次数
Ag	抗原(包被孔板)
DIL	稀释
BUF | WASH | 20X	润洗缓冲液 20x 浓度
H_2SO_4 | 0.5M	硫酸，0.5摩尔(终止溶液)
CONJ	耦联
SOLN | TMB	TMB溶液（底物溶液）

CAL	X	标准物，X = 浓度
+	CONTROL X	阳性对照，X =浓度
-	CONTROL X	阴性对照，X = 浓度
R	CONTROL X	参考对照，X =浓度

EURO-DIAGNOSTICA AB
Medeon, SE-205 12 MALMö, Sweden
Phone: +46 40 32 11 00, Fax: +46 40 92 31 50
E-mail: info@eurodiagnostica.se
www.eurodiagnostica.com